
TÉCNICAS DE AISLAMIENTO Y PRESERVACIÓN DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

Los hongos entomopatógenos, afectan a varias especies de insectos en forma natural, los cuales pueden ser fácilmente producidos así como conservados por cortos o largos periodos de tiempo y sus esporas pueden ser aplicadas con aspersores convencionales. Estos enemigos naturales, hongos entomopatógenos y antagonistas, constituyen un componente importante de control, siendo objeto de diversos estudios para su uso dentro de programas de Manejo Integrado de Plagas.

MANEJO DE ENTOMOPATÓGENOS

- » Para el aprovechamiento de organismos causantes de enfermedades de insectos y el control microbiano de fitopatógenos, es fundamental su diagnóstico.
- » El diagnóstico estudia la etiología, sintomatología, patogénesis y epizootiología de la enfermedad.
- » En términos generales, el diagnóstico comprende la colección y análisis de hechos y datos como la historia de la enfermedad, el examen físico, el examen micro y macroscópico y el examen de laboratorio, que comprende el aislamiento y estudio del hongo entomopatógeno aislado.

DETECCION DE SINTOMAS

- » Uno de los síntomas más evidentes, es el crecimiento del hongo sobre la superficie de su hospedero.
- » Algunos hongos no presentan desarrollo visible a la superficie, o frecuentemente producen estructuras no evidentes o insignificantes que dificultan su detección, siendo también su crecimiento y desarrollo limitado por condiciones ambientales no propicias.

DIAGNOSTICO

Sintomatología

- » Síntoma: cualquier alteración física que se manifiesta a través de cambios en la estructura o en el comportamiento del insecto, como cambio de coloración, vómito, pérdida de apetito, anormalidad morfológica, etc.
- » Signo: estructuras del patógeno asociados al tejido del insecto enfermo, como micelio, esporas, estromas, etc.

FUNGOSIS

- » Actividad reducida
- » Lenta pérdida de apetito.
- » Tegumento endurecido, momificado.
- » Cubierto por micelio y esporas de color blanco, verde, de acuerdo a la especie



HONGOS ENTOMOPATOGENOS

- » Son microorganismos que viven a expensas de insectos de diferentes órdenes en forma natural, no causan daño al hombre, animales ni plantas.
- » Requieren de una adecuada humedad, pH y temperatura para su natural dispersión e infección.



COLECCIÓN DE INSECTOS ENFERMOS

- » Colectar consiste en recoger insectos vivos o muertos, en el follaje, axilas, tallos, corteza de los árboles, sobre la superficie o en el interior de éstos y en el suelo.
- » Los insectos infectados con entomopatógenos, vivos o muertos se encuentran en ecosistemas naturales, acuáticos o terrestres, agroecosistemas y en crías masivas de insectos.
- » Si el insecto se encuentra pegado a una superficie, es necesario cortar la porción del sustrato que lo contiene y colocarlo en una placa o frasco, pero nunca en sobre de papel o en medio líquido. El material se conserva mejor si se mantiene a bajas temperaturas.
- » Es posible colectarlos sin haber encontrado el hospedero enfermo, haciendo uso de insecto trampa para aislar hongos entomopatógenos que se encuentran en el suelo.

ACONDICIONAMIENTO DE MUESTRAS

- » Los insectos muertos, se acondicionan en frascos de vidrio o plástico, evitando la introducción de tierra u otro material contaminante. enviar como mínimo 10 individuos, ya que es posible que se contaminen varios de ellos.
- » Las queresas y ninfas de mosca blanca, se encuentran pegadas en las hojas, se debe recolectar las hojas con los insectos, ponerlos en una placa de Petri o en un taper, no poner algodón o papel humedecido, ya que la humedad favorece el crecimiento de bacterias u hongos saprófitos.

- » También se puede engrapar las hojas en que se encuentran los insectos micosados en papel para evitar que las hojas al secarse se arruguen y se pierda la muestra, además el papel absorberá la humedad de la hoja.

DATOS DE COLECCIÓN

- » 1. Nombre del cultivo:
- » 2. Nombre del insecto: (familia, género, especie).
- » 3. Lugar:
 - » Sector:
 - » Distrito:
 - » Caserío:
 - » Provincia:
 - » Departamento:
 - » Región:
- » 4. Fecha de colección:
- » 5. Nombre del fundo:
- » 6. Nombre del agricultor:
- » 7. Nombre del colector:
- » 8. Coordenadas:
- » 9. Altitud:
- » 10. Temperatura °C:
- » 11. Humedad Relativa:
- » Se aplicó anteriormente hongos entomopatógenos ?

AISLAMIENTO

- » Aislar los microorganismos asociados al insecto en colonias puras.
- » Evitar el empleo de material descompuesto, en donde fácilmente proliferan microorganismos contaminantes o saprofitos.
- » Usar el material colectado a la brevedad posible, si no es posible, almacenarlo a bajas temperaturas, manteniéndolo lo más seco posible

TECNICAS DE AISLAMIENTO

- » Siembra directa de esporas o aislamiento directo
- » Transferencia del insecto o partes del tejido atacado
- » Técnica del insecto trampa

AISLAMIENTO DIRECTO

Consiste en la obtención directa del hongo a partir del cuerpo del insecto. Se requiere que el insecto atacado esté esporulado y no presente contaminantes. Esta técnica no es muy ventajosa, las muestras que se toman del insecto pueden estar sucias y acarrear problemas de contaminación en el aislamiento.

Procedimiento:

1. Observar al insecto bajo el estereoscopio para detectar las áreas de mayor esporulación.
2. Con la ayuda de un asa o aguja entomológica flameada coger las esporas del insecto micosado.
3. Sembrar en caja de Petri o tubo de ensayo en el medio de cultivo adecuado.

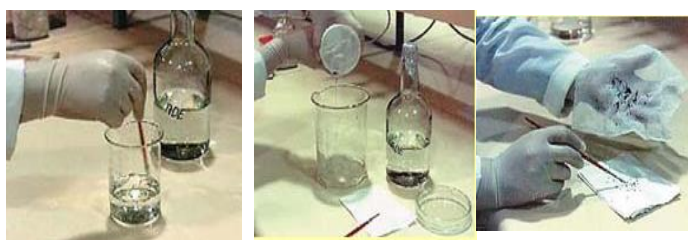
4. Incubar

CAMARA HUMEDA

Cuando no se observa esporulación y se sospecha de infección, las muestras recolectadas se ponen en cámara húmeda para favorecer la esporulación

Procedimiento:

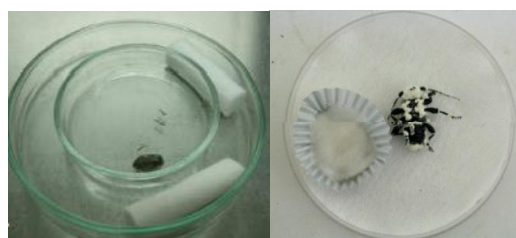
1. Remojar el insecto en hipoclorito de sodio (0.5% del producto activo) durante 1 a 5 minutos.
2. Enjuagar de 3 a 4 veces con agua destilada estéril para eliminar el cloro.
3. Poner los insectos sobre papel toalla estéril para eliminar el exceso de humedad.
4. Colocar papel filtro estéril en una placa de Petri esterilizada y agregar agua destilada estéril.
5. Colocar el insecto sobre el papel filtro dentro de la placa de Petri
6. Sellar la placa con parafilm.
7. Incubar a 26 °C durante 7 días, hasta observar desarrollo de micelio sobre el cuerpo del insecto muerto.
8. Con una aguja de siembra, en la cámara flujo laminar, tocar levemente el cuerpo del insecto donde se vea crecimiento fungoso y transferirlo a una placa de Petri con medio de cultivo.



Desinfección

Enjuague

Secado



Cámara húmeda

TRANSFERENCIA DEL INSECTO

Se usa cuando no hay presencia de esporas en el insecto colectado.

Cuando se observa el crecimiento de contaminantes junto con las esporas del hongo que se desea aislar.

Procedimiento:

1. Desinfectar la superficie del insecto por inmersión en hipoclorito de sodio al 0.5% por 1 a 5 minutos.
2. Enjuagar 3 veces en agua destilada estéril.
3. Secar el exceso de agua con papel filtro o toalla estéril.
4. Transferir partes del insecto a cajas de Petri con medio de cultivo
5. Incubar a 27°C hasta lograr el desarrollo del hongo deseado

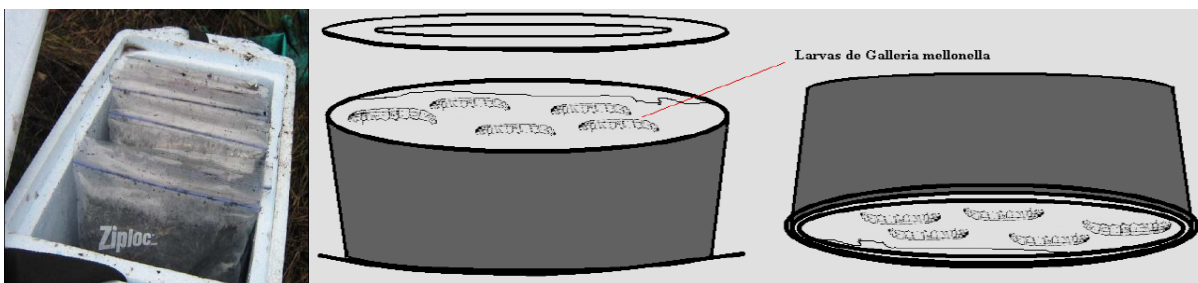
TECNICA DEL INSECTO TRAMPA

- » Hacer un muestreo de suelo.
- » Acondicionar y llevar al laboratorio lo más pronto posible
- » Usar insectos vivos para capturar aislamientos virulentos capaces de causar mortalidad.
- » *Galleria mellonella* y otras especies son usados como cebos

Procedimiento:

1. Tomar muestras de suelo en varias zonas, a una profundidad de 15 cm, usando una lampita o pala, en un volumen de 1000 gramos. En cada área coleccionar 3 muestras, haciendo un total de 3 submuestras por cada área.
2. Colocar las 3 submuestras en una bolsa de plástico, mezclarlas y colocar en un cooler o caja de tecnopor con hielo, para ser transportado al laboratorio.
3. En el laboratorio, si el suelo está muy seco, agregar agua, para darle la humedad adecuada, el suelo debe quedar húmedo, no mojado.
4. Colocar el suelo húmedo en envases limpios de ½ litro.
5. Colocar 10 larvas de *Galleria mellonella* sobre la superficie del suelo de cada muestra y cubrir con su tapa.
6. Invertir el recipiente y colocar a 22 – 24 °C.
7. A los 7 días revisar y retirar los insectos muertos.
8. Enjuagar los cadáveres con agua estéril.
9. Colocar los cadáveres recuperados de cada suelo, en forma separada, sobre una placa de Petri con papel filtro.
10. Las larvas muertas por hongos entomopatógenos, presentan manchas oscuras ligeramente hundidas y/o momificación, o también pueden presentar desarrollo micelial..





MEDIOS DE CULTIVO

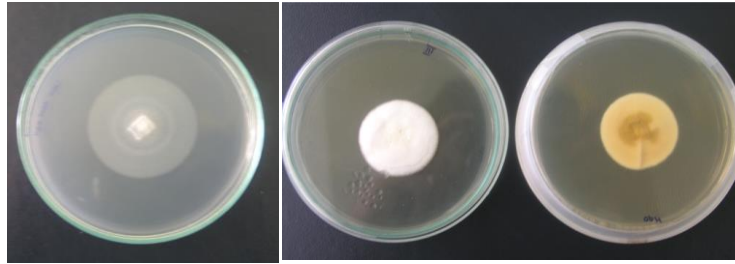
- El medio de cultivo es una sustancia o solución que permite el desarrollo de microorganismos.
- Deben contener los nutrientes necesarios para asegurar el desarrollo y reproducción de los hongos (carbono, nitrógeno, vitaminas, oligoelementos, etc.) y un pH ligeramente ácido (6 – 6.5) para facilitar su crecimiento e inhibir al mismo tiempo el desarrollo de otros microorganismos.
- Se puede añadir antibióticos para inhibir el crecimiento de bacteria saprófitas que suelen contaminar las muestras.

CULTIVO MONOSPÓRICO

- Se obtiene a partir de una espora con un contenido genómico único, que corresponde a un clon genéticamente uniforme de una célula individual, con la finalidad de minimizar la variabilidad genética de los hongos entomopatógenos en producción
- Los aislamientos monospóricos pueden ser por:
 - » Colonia
 - » Punta de hifa

POR COLONIA

1. Con el asa de siembra extraer esporas de una placa esporulada.
2. Colocar las esporas en un tubo de prueba con 10 ml de Tween 20 al 0.1% y mezclar por ½ minuto en el vórtex.
3. Diluir hasta contar en la cámara de Neubauer 50 a 100 esporas/ml.
4. Las placas con medio de cultivo son marcadas por el reverso con líneas en forma de la letra "W".
5. Tomar con el ansa una gota de la dilución y arrastrar la gota siguiendo la dirección de la línea marcada, cuidando de no romper el medio de cultivo.
6. Las placas son incubadas durante 48 horas a 26 °C.
7. Observar al microscopio la presencia de colonias aisladas y con un bisturí estéril cortar un bloque de medio que contiene la colonia elegida.
8. Colocar el bloque en la parte central de una placa de Petri con medio de cultivo apropiado con antibiótico.
9. Incubar a 26 °C por 8 a 10 días.



CONSERVACION DE CEPAS

La conservación de cepas, el mantenimiento y la construcción de colecciones es importante en el estudio de la microbiología y en el desarrollo e investigación de la misma.

Esto se debe a que en el transcurso del tiempo, la selección de microorganismos se ha constituido en la base de múltiples procesos biotecnológicos, como la producción de antibióticos, solventes orgánicos, enzimas, entre otros,

Los objetivos de la conservación de cepas son:

1. Mantener la pureza del aislamiento.
2. Conservar la viabilidad.
3. Estabilidad genética en el tiempo (evitar posibles cambios de la población por efecto de selección)

METODOS DE CONSERVACION

A corto plazo (desde varios meses a años)

1. Transferencia periódica en medio de cultivo o Subcultivo
2. Conservación en aceite mineral
3. Conservación en agua destilada
4. Sílica gel
5. En papel filtro

A largo plazo (conservación por décadas)

1. Nitrógeno líquido
2. Liofilización

TRANSFERENCIA EN MEDIO DE CULTIVO

También denominado subcultivo. Es el método más utilizado, no requiere de equipos específicos

La conservación se realiza a temperatura ambiente o refrigeración.

Consiste en:

1. Preparación de medios de cultivo en tubo inclinado
2. Siembra de conidios, (estría)
3. Incubación a 26 °C hasta obtener esporulación
4. Refrigeración (4°C), o conservación a temperatura ambiente.

5. Repicado cada cierto tiempo, para garantizar la obtención de un cultivo fresco (2 y 6 meses).

Tiene la desventaja de la pérdida de patogenicidad, virulencia o esporulación



ACEITE MINERAL

Previenen la deshidratación

- » Reducen la actividad metabólica y el crecimiento
- » Reducen la tensión del oxígeno (cambios gaseosos)
- » Se utilizan para hongos que no toleran la liofilización o cuando la conservación es costosa.
- » Las cepas pueden conservarse por varios años.

Procedimiento:

Preparar medios de cultivo en tubo inclinado

1. Sembrar del hongo en estría e incubar
2. Esterilizar el aceite mineral a 120 °C por 3 veces, dejando reposar entre esterilización 24 horas.
3. Llenar los tubos esporulados con el aceite mineral a un nivel de 1 cm por encima del medio de cultivo
4. Sellar los tubos con parafina
5. Conservar a temperatura ambiente o refrigeración en forma vertical

AGUA DESTILADA

Hongos Entomophthorales

Procedimiento:

1. Preparar medio de cultivo en tubo inclinado
2. Sembrar del hongo en estría e incubar
3. Cosechar las esporas en agua destilada estéril
4. Colocar la solución de spora-agua en viales en una proporción de 1:2 (v/v)
5. Mantener a temperatura ambiente o refrigeración a 4 °C
6. Centrifugar 1 mL de la suspensión de esporas obtenida directamente del cultivo, en tubos Eppendorf, con capacidad de 1,5 mL a 12 000 r.p.m. durante 5 min
7. Desechar el sobrenadante.
8. Resuspender el concentrado celular en 1 mL de agua destilada estéril.
9. Almacenar en refrigeración a 4 °C.

SILICA GEL (1)

1. Esterilizar en autoclave tubos de vidrio con tapa rosca de 4 ml de capacidad, con la respectiva identificación incluida dentro del tubo.

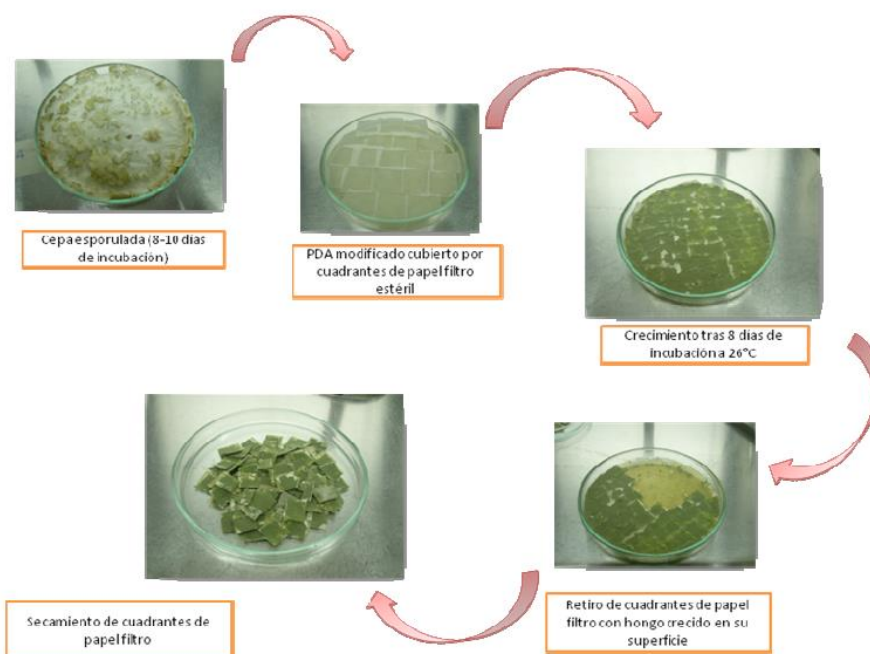
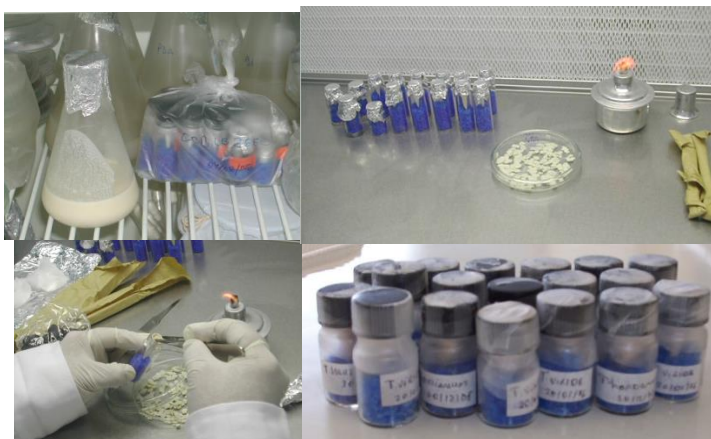
2. Colocar el sílica gel (6 – 22 mesh sin indicador), en 3/4 partes del tubo de vidrio y esterilizar con aire caliente en un horno a 180 °C por 3 horas.
3. Mantener los tubos en congelación hasta su uso.
4. A un tubo de vidrio conteniendo PDA y el hongo desarrollado agregar 3 ml de agua destilada estéril.
5. Con la ayuda de un ansa de siembra, retirar todo el desarrollo micelial del hongo y agitar en un vortex durante 15 minutos.
6. En una cámara e flujo laminar, con ayuda de una micropipeta, agregar 500 µl de la suspensión de conidias al tubo de sílica gel preparado.
7. Sellar los tubos con parafilm y ponerlos en una incubadora a 20 °C por 15 días.
8. Conservar los tubos incubados a 4 °C

SILICA GEL (2)

1. Llenar tubos con 2.5 mm de sílica gel
2. Tapar los tubos con algodón y esterilizar en estufa a 180 °C por 2 horas.
3. Esterilizar tapones de plástico a 120 °C por 15 minutos en papel aluminio y secar en horno.
4. Quitar el tapón de algodón de los tubos y colocar el de plástico, mantener a temperatura ambiente.
5. Esterilizar leche descremada al 5 – 7% a 120 °C por 5 minutos.
6. Hacer una suspensión de conidios con la leche descremada.
7. Colocar los tubos con sílica gel en hielo por 15 minutos.
8. Agregar 1 ml de la suspensión de conidias poco a poco, evitando la formación de burbujas de aire.
9. Conservar a -20 °C

DESECACION EN PAPEL DE FILTRO

1. Poner 3 g de sílica gel con indicador, en un frasquito de vidrio de 10 ml.
2. En la boca del frasquito colocar un cono hecho de papel bond de 80 g y taparlo con papel aluminio.
3. Esterilizar en el horno a 180 °C durante una hora.
4. En una placa esporulada de la especie de hongo a conservar, agregar 10 ml de leche estéril al 20%.
5. Con una pipeta verter la suspensión en una placa de Petri estéril, y con la ayuda de la pinza estéril sumergir pedacitos de papel filtro estéril de 0,5 cm².
6. Extraer los papelitos de la suspensión leche - hongo y colocarlos sobre papel toalla estéril para retirar el exceso de líquido.
7. Los papelitos son distribuidos uniformemente en una placa de Petri estéril, se incuba a 25 ± 2 °C durante 24 a 36 horas.
8. Transcurrido ese tiempo se colocan aproximadamente 30 papelitos en el cono del frasco, enseguida se reemplazará la tapa de papel aluminio por la tapa de rosca estéril.
9. Posteriormente los frascos etiquetados, indicando el código de la cepa y fecha.
10. Las cepas son conservadas a 4 °C.



LIOFILIZACION

Es un proceso en el cual, el agua es eliminada rápidamente por evaporación de la muestra congelada, durante este proceso los hongos se mantienen en una solución “soporte” (lecha descremada), se congelan y exponen al vacío.

Los hongos conservados con esta técnica tienen pocas posibilidades de contaminación y se almacenan a largo plazo.

Procedimiento (1):

1. Sembrar el hongo a conservar e incubar hasta obtener abundante esporulación
2. Esterilizar leche descremada al 5%
3. Esterilizar tubos viales a 120 °C por 20 minutos
4. Suspende esporas del hongo en leche descremada.
5. Mantener la suspensión en refrigeración por 30 minutos.
6. Congelar a -50 °C, en ultracongelador o en nitrógeno líquido.
7. Colocar en el liofilizador hasta que el material esté completamente seco.
8. Retirar del liofilizador y sellar manteniendo los viales cerca del mechero
9. Conservar a 4 °C

Procedimiento (2):

1. Esterilizar en autoclave tubos con tapa rosca, previamente identificados y con 0.25 cm² de algodón.
2. Al tubo con el hongo desarrollado, agregar 2 ml de una suspensión crioprotectora a base de glucosa y gelatina.

Preparación glucosa:

- Un litro de agua destilada con 6 g de glucosa
 - Un litro de agua destilada con 6 g de agar
 - Esterilizar en autoclave a 15 lb de presión por 15 minutos.
3. Añadir al tubo 1 ml de cada preparación
Con un ansa de siembre separar el cultivo del medio.
 4. Añadir 200 µl de la suspensión de hongo en el tubo estéril.
 5. Cerrar los tubos y llevarlos a - 80 °C de 10 a 15 minutos y luego liofilizarlos por 48 horas.
 6. Retirar los tubos del liofilizador, cerrarlos bien y sellarlos con parafilm.
 7. Conservar a 4 °C

NITROGENO LÍQUIDO

Es la técnica más conveniente a largo plazo y la más costosa, depende de un continuo suministro de nitrógeno.

Todos los hongos pueden ser conservados con esta técnica.

Procedimiento:

1. Suspende fragmentos de micelio y conidios en glicerol al 10° o en dimetilsulfoxido al 5%.
2. Depositar 0.5 ml en ampolletas.
3. Sellar y sumergir en el tanque de nitrógeno líquido a temperatura aproximada de -190 °C

CARACTERIZACION DE HONGOS BENEFICOS

Para la utilización de los hongos benéficos con fines de control se tiene que caracterizarlos, con el objetivo de tener cepas altamente virulentas para ser aplicadas en campo

La caracterización es:

Morfológica

» Descripción de la colonia

- » Descripción del hongo

Fisiológica

- » N° de conidias,
- » Viabilidad

ASEPCIA

- » Todo el trabajo de aislamiento y conservación de cepas se hace en forma aséptica
- » Se debe trabajar con materiales estériles y en un medio ambiente desinfectado.
- » Existen diferentes técnicas que se utilizan en un laboratorio para garantizar la pureza de las cepas y también para preservar al personal de posibles contaminaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Distribution, occurrence and potential use of entomopathogenic fungi in arable soil in Czech Republic. University of Florida USA

Producción y uso de hongos entomopatógenos. FUNICA. CATIE. Nicaragua

Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. CIP, Perú

Producción y uso de hongos entomopatógenos. SCB – SENASA. Perú

Manejo y conservación de hongos entomopatógenos. Centro Nacional de Referencia de Control Biológico. Tecomán, Colima. Méjico